

COMPUESTOS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA FORMACIÓN DE FIBRILAS AMILOIDES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere al campo del tratamiento de las enfermedades amiloides, en particular a agentes inhibidores de la amiloidogénesis y, más en particular, a compuestos inhibidores de la formación de fibrillas amiloides asociadas a la transtiretina. Asimismo, la invención se refiere al uso de dichos compuestos para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de fibrillas amiloides, principalmente enfermedades neurodegenerativas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Una característica común entre las enfermedades neurodegenerativas amiloides es la deposición de fibrillas de alto peso molecular con estructura de lámina-beta cruzada a partir del autoensamblaje de una de las aproximadamente veinte proteínas humanas de las que se conoce su implicación en este tipo de afecciones (Kelly, J.W. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 6 (1996) 11; Kelly, J.W. *Structure*, 5 (1997) 595; Kelly, J.W. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 5 (1998) 101; Lansbury, P.T. *Biochemistry*, 31 (1992) 6865; Sipe, J.D. *Ann. Rev. Biochem.*, 61 (1992) 947; Sipe, J.D. *Crit. Rev. in Clin. Lab. Sci.*, 31 (1994) 325; y Blake, C., Serpell, L. *Structure*, 4 (1996) 989).

25 En el caso concreto de la transtiretina (TTR) que se engloba en el grupo de proteínas amiloides mencionado anteriormente, la deposición de fibrillas de su variante nativa que se infiltran en el corazón parece ser la causa de la amiloidosis sistémica senil (cardiomielopatía) (Cornwell, G.C., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154 (1988) 646). Análogamente, la deposición de alguna de entre sus 60 mutantes conocidas en un solo

residuo que hacen a la TTR más amiloidogénica, parece asociada a una serie de alteraciones que se conocen colectivamente como polineuropatías amiloïdes familiares (Jacobson, D.R., et al.. *Adv. Human Genetics*, **20** (1991) 69). A diferencia de otros síndromes neurodegenerativos, estas enfermedades no afectan al cerebro pero sí a ciertos órganos y al sistema nervioso periférico. Así los pacientes afectados por estas enfermedades familiares presentan neuropatías periféricas y/o disfunciones orgánicas causadas por neurotoxicidad amiloidea y/o interferencia física con el funcionamiento normal de órganos vitales que se manifiestan a edades tan tempranas como los 20 años. En la actualidad, no existe ni se ha propuesto ningún tratamiento farmacológico para esta clase de enfermedades amiloïdes siendo la única intervención terapéutica disponible y efectiva el trasplante de hígado, órgano en el que se biosintetiza la transtiretina.

Las enfermedades amiloïdes relacionadas con la transtiretina fueron unas de las primeras en las que se descubrió que transcurren a través de formación de fibrillas originadas por un cambio conformacional en una proteína concreta. En su forma natural, la TTR está organizada como un tetramero que eventualmente se disocia en sus monómeros los cuales son capaces de autoasociarse en fibrillas de unos 130 Å de diámetro constituidas a su vez por protofilamentos, cada uno de ellos formados por una estructura plegada en lámina-beta cruzada (Serpell L.C. et al. *J. Mol. Biol.*, **254** (1995) 113; y Kelly J.W., et al., *Adv. Protein Chem.*, **50**, 161). Este conocimiento a nivel molecular de la formación de las fibrillas de TTR ha sido posible gracias a que esta amiloidosis ha podido ser estudiada *in vitro* ya que el medio ácido es un desencadenante natural del proceso (Cotón, W., et al. in *Transthyretin acid induced denaturation is required for amyloid fibril formation in vitro*. Eds., Plenum Press, New York, 1991, p 99). Así, mediante experimentos de desnaturación ácida parcial de TTR en un medio que simula las condiciones presentes en el lisosoma (pH: 5,5), se ha concluido que las fibrillas se generan a partir de intermedios conformacionales (intermedio

amiloidogénico) de las unidades monoméricas de la transtiretina. Estas investigaciones han confirmado que en forma tetramérica la TTR no es amiloidogénica, pero que la disociación del tetrámero en un monómero con un estructura terciaria alterada pero definida es la que da lugar a la formación de fibrillas (Lai, Z., et al., J.W. *Biochemistry*, **35** (1996) 6470; y Quintas, A., et al., *J. Biol. Chem.*, **274** (1999) 32943).

La transtiretina, también conocida como prealbúmina, se encuentra en el plasma humano (3,6 μ M) y en el líquido cefalorraquídeo. Está compuesta por 4 cadenas peptídicas idénticas de 127 aminoácidos ricas en estructura beta formando un dímero de dímeros cuya masa es de 55 kDa y cuya estructura es conocida por difracción de rayos X (Blake, C.C.F., et al., *J. Mol. Biol.*, **121** (1978) 339; y Hamilton, J.A., et al., *J. Biol. Chem.*, **268** (1993) 2416). Este tetrámero se une y transporta a la hormona tiroxina y a la proteína de unión al retinol. Estudios de difracción de rayos X han revelado también que la TTR presenta dos lugares de unión para la tiroxina que tienen forma de embudo y están bien definidos por las interfaes dímero-dímero (Wojtczak, A., et al., *J. Biol. Chem.*, **267** (1992) 353; y Wojtczak, A., et al., *Acta Cryst.*, **D52** (1996) 758). Es decir, cada tetrámero puede unirse a dos moléculas de tiroxina. Esta unión muestra cooperatividad negativa para la entrada de la segunda molécula de ligando.

Recientemente se ha demostrado que la forma tetramérica de la TTR puede ser estabilizada frente al medio ácido inductor de amiloideogénesis mediante la unión a pequeñas moléculas orgánicas que mimetizan la estructura del ligando natural. Las pruebas de que estos ligandos previenen la formación de fibrillas provienen únicamente de experimentos *in-vitro* y *ex vivo*. Entre estas moléculas se encuentran moléculas de antiinflamatorios no esteroideos como el ácido flufenámico (Peterson, S.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** (1998) 12956) y el diflunisal (Baures, P.W., et al., J.W. *Bioorg. Med. Chem.*, **7** (1999) 1339), así como moléculas de una serie de

principios activos de fármacos entre los que se encuentran flavonas, tetrahidroquinolinas, dihidropiridinas y benzodiacepinas (Baures, P.W., et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **6** (1998) 1389) así como derivados del ácido antranílico (Oza, V.B., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9** (1999) 1).

5

De un modo puramente empírico e intuitivo estos estudios han llegado a elucidar algunos requerimientos estructurales que deben tener los inhibidores de la disociación del tetrámero de TTR que pueden resumirse como sigue:

10

- Estructuras bifenilo, dibenzofurano, diaril éter, estilbeno y flavona pueden acomodarse en el sitio de unión (Baures, P.W., et al., J.W. *Bioorg. Med. Chem.*, **6** (1998) 1389). Análogos del ácido flufenámico con estructura de ácido antranílico son también buenos inhibidores (Oza, V.B., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9** (1999) 1). En general, parece que el farmacóforo debe tener dos anillos aromáticos pudiendo ser uno de ellos bico tricíclico. Uno de los anillos o fusión de anillos ocuparía la parte externa del sitio de unión (Baures, P.W., et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **7** (1999) 1339).

15

- La presencia de un grupo ácido carboxílico posiblemente optimiza la unión a la TTR vía interacción con la(s) Lys en posición 15 (Baures, P.W., et al., J.W. *Bioorg. Med. Chem.*, **6** (1998) 1389). Este grupo ácido puede también ser un fenol (Baures, P.W., et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **7** (1999) 1339).

20

La búsqueda de inhibidores de la disociación de TTR iniciada mediante estos primeros trabajos no ha sido sistemática y tan sólo se ha descubierto que el ácido flufenámico es un buen inhibidor. Así, por ejemplo, se han ensayado 79 compuestos descritos en Baures et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **6** (1998) 1389, y en Baures, P.W., et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **7** (1999) 1339, todos ellos de origen comercial. Asimismo, se han sintetizado

25

30

una serie de productos (Oza, V.B., Petrassi H.M., Purkey H.E., Kelly, J.W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9** (1999) 1) en base a los datos estructurales obtenidos mediante el análisis por difracción de rayos X del complejo de la TTR y el ácido flufenámico (Peterson, S.A., Klabunde, T., Lashuel, H.A., Purkey, H., Sacchettini, J.C., Kelly, J.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** (1998) 12956).

Igualmente, en la solicitud de patente internacional WO 98/27972 se describen compuestos que estabilizan una proteína amiloidogénica como la TTR mediante la formación de un conjugado proteína-fármaco. Entre dichos compuestos se mencionan compuestos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y, entre ellos, el diflunisal. También, AINES tales como el ibuprofeno, la indometacina y el sulindac sulfuro se han postulado y siguen investigándose como posibles agentes terapéuticos de los procesos de amiloidosis que ocurren en la enfermedad de Alzheimer (S. Wegen et al. *Nature*, **414** (2001) 212-216)

El uso del diflunisal, entre otros AINEs, como ligando selectivo de la TTR ya se había descrito en la patente estadounidense US 5714142, en este caso para aumentar la vida media en suero de agentes farmacológicamente activos.

Sin embargo, el uso del diflunisal para estabilizar la estructura tetramérica de la TTR y, por tanto, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la formación de fibrillas amiloides, sigue presentando una serie de inconvenientes propios de los AINEs como son los efectos-secundarios-de tipo-gastrointestinal-y-cardiovascular.

Así pues, continúa existiendo en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar agentes inhibidores de la disociación de TTR alternativos que sean más eficaces y que presenten menores efectos secundarios.

Sorprendentemente, los presentes autores han descubierto que una serie de derivados yodados del diflunisal son potentes agentes antiamiloidogénicos con una eficacia superior a la del diflunisal y, por tanto, con menores efectos secundarios que éste, al poder ser administrados en menores dosis.

5

Hasta ahora no se han descrito derivados del diflunisal yodados en el anillo salicílico. En la patente europea EP 0082404 se describen una serie de derivados de tipo éster del diflunisal, útiles como antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, entre los que no se encuentran los mencionados derivados yodados.

10

15

El objeto de la presente invención, por tanto, es proporcionar potentes agentes inhibidores de la amiloidogénesis, más eficaces y con menores efectos secundarios.

OBJETO DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos inhibidores de la amiloidogénesis.

20

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de preparación de dichos compuestos.

25

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que contiene dichos compuestos.

30

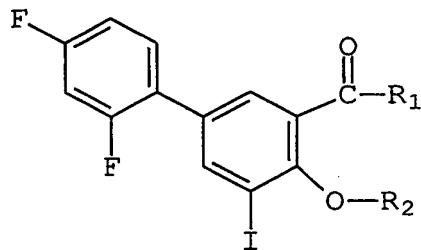
Por último, otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso terapéutico de dichos compuestos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un gráfico en el que se representa la velocidad de agregación, v_0 , frente a la concentración de inhibidor, $[I]$, para un compuesto de la invención, yododiflunisal, con respecto a dos compuestos de la técnica, diflunisal y diflunisal éster.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona un compuesto de fórmula estructural (I):



(I)

en la que

R_1 es un grupo $-NR_aR_b$, siendo R_a y R_b , independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆; un grupo $-OR_c$ siendo R_c un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆; un glucosilo; un polihidroxialquilo C₁-C₆; o un grupo $-NH-CH(R_d)-COOR_e$, siendo R_d una cadena lateral de uno de los 20 alfa-aminoácidos naturales en cuaquiera de sus dos formas L o D enantioméricamente puras; y R_e un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆; y

R_2 es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un glicosilo; un polihidroxialquilo C₁-C₆; un grupo $-C(=O)-R_f$, siendo R_f un grupo alquilo C₁-

C₆; o un grupo -CH₂-COO-R_g, siendo R_g un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆;
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5 En la presente invención, el término "grupo glicosilo" se refiere a un radical obtenido por eliminación de un grupo OH de la función hemiacetal de un monosacárido, es decir un grupo de fórmula C₆H₁₁O₅ o C₆H₁₀O₆. Asimismo, el término "grupo polihidroxialquilo C₁-C₆" se refiere a un grupo alquilo sustituido con varios grupos OH.

10 En una realización preferente, los compuestos de la invención son compuestos de fórmula (I) en los que R₁ se selecciona de entre: OH, NH₂, OMe, OEt, o un grupo CH(R_d)-COR_e, siendo R_d la cadena lateral de la glicina, la alanina, la leucina, la valina, el ácido aspártico o la asparagina y siendo R_e H o un grupo alquilo C₁-C₆; y R₂ se selecciona entre: H, Me, glucosilo, un grupo -C(=O)-R_f, siendo R_f un grupo Me, Et, t-Bu; o un grupo -CH₂-COO-R_g, siendo R_g un átomo de hidrógeno o un grupo t-Bu.

15 En otra realización preferente de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan de entre los siguientes compuestos:

- [1] ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico;
- [2] 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilato de etilo;
- [3] 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilato de metilo;
- 25 [4] 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilamida;
- [5] [2-aminocarbonil-4-(2,4-difluorofenil)-6-yodo-fenoxy]-acetato de terc-butilo;
- [6] ácido [2-aminocarbonil-4-(2,4-difluorofenil)-6-yodo-fenoxy]acético;
- [7] 1-O-β-glucósido del ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico;
- 30 [8] 2',4'-difluoro-4-metoxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo;
- [9] ácido 2',4'-difluoro-4-metoxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxílico;

- [10] 2',4'-difluoro-4-acetiloxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo;
[11] ácido 2',4'-difluoro-4-(*t*-butilcarboniloxi)-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxílico;
[12] ácido 2',4'-difluoro-4-(etilcarboniloxi)-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxílico;
[13] éster etílico de la N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]glicina;
5 [14] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]glicina;
[15] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]alanina;
[16] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]leucina;
[17] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]serina;
10 [18] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]valina;
[19] ácido N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]-aspártico;
[20] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]asparagina.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula (I), caracterizado porque comprende una etapa de reacción del diflunisal o derivados del mismo con un reactivo de yodación.

La yodación del diflunisal o de compuestos derivados del diflunisal es obvia para cualquier experto en la materia quién seleccionará de forma adecuada tanto el compuesto de partida como el reactivo de yodación. Asimismo, la preparación de derivados del diflunisal (ésteres, carboxamidas, sales, glucósidos, derivados de aminoácidos, etc.) será obvia para el experto. Por otro lado, el reactivo de yodación puede seleccionarse de entre: yodo elemental; sales de yoduro tales como yoduro sódico o yoduro potásico; sales de yodonio tales como cloruro de yodo; complejos de yodonio tales como el tetrafluoroborato de bis(piridina)yodonio (I) o el hexafluorofosfato de bis(sim-colidina)yodonio (I); y compuestos orgánicos de yodo tal como el diacetato de yodobenceno o la N-yodosuccinimida.

Asimismo, otro objeto de la presente invención es proporcionar también una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la

invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables serán aquellos excipientes de la técnica que permitan la formulación adecuada de la composición farmacéutica de la invención. Dicha composición puede formularse para su administración oral, intravenosa, tópica, rectal, subdérmica, etc. Es decir, puede presentarse en forma de soluciones, comprimidos, cápsulas, implantes, etc. Asimismo, dicha formulación puede ser de liberación inmediata o de liberación controlada.

En cualquier caso, será el facultativo el que determine la dosificación más adecuada de la misma en función de la edad del paciente, su estado de salud general, su peso, y el tipo y extensión de la enfermedad o trastorno a tratar.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar los compuestos de la invención para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas amiloïdes, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, fibrosis cística, diabetes de aparición tardía, enfermedad de las neuronas motoras, fiebre mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, mieloma idiopático, cardiopatía amiloide, síndrome de Down, enfermedad de Kuru, síndrome de Gerstmann-Straussler-Schienker, depósitos valvulares de amiloide, amiloidosis en pacientes con diálisis, miositis con cuerpos de inclusión, depósitos musculares de amiloide, anemia de Sickle Cell, amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide familiar I, polineuropatía amiloide familiar III, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, amiloidosis relacionada con angiopatías, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa, ~~diabetes de tipo II, carcinoma medular de tiroides, encefalopatía espongiforme, amiloidosis atrial, amiloidosis sistémica~~

hereditaria no neuropática, amiloidosis localizada por inyección, y amiloidosis renal hereditaria.

En una realización preferida de la presente invención, los compuestos de la invención pueden emplearse también como medicamento analgésico, antiinflamatorio, antipirético o antiagregante plaquetario para el tratamiento de enfermedades tales como artritis reumatoide, fiebres reumatóides, osteoartritis, dolores musculoesqueléticos, síndrome del intestino inflamado, enfermedades de las arterias coronarias o trombosis postoperatorias en venas profundas.

10

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención.

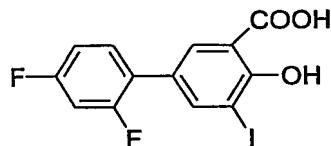
EJEMPLOS DE PREPARACIÓN

15

Ejemplo 1

Ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico

20



25

Por yodación del ácido 5-(2,4-difluorofenil)salicílico (diflunisal) con el reactivo tetrafluoroborato de bis(piridina)yodonio (I) (Ipy_2BF_4)

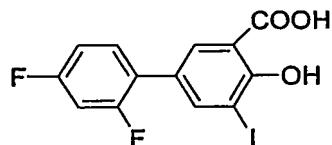
35

A una disolución de 200 mg (0,80 mmol) de diflunisal en 5 ml de diclorometano se añaden a temperatura ambiente 357 mg (1,2 mmol) de Ipy_2BF_4 . Se deja en agitación hasta que se observa mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) que se ha consumido el producto de partida. Se diluye en diclorometano y se procede a aislar el producto

(work-up) por acidificación con ácido HCl 1 N y extracción con diclorometano. Se reúnen las fases orgánicas y se lavan con una disolución de tiosulfato sódico y después se seca en sulfato magnésico anhidro. Se elimina el disolvente a presión reducida y se obtienen un crudo de pureza 98% que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice. Se obtienen 290 mg (96% de rendimiento) del producto deseado.

Ejemplo 2

10 Ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico



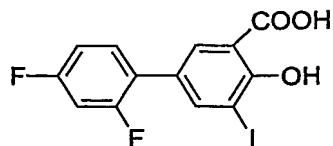
15 Por yodación del ácido 5-(2,4-difluorofenil)salicílico (diflunisal) con el reactivo hexafluorofosfato de bis(2,4,6-timetilpiridina)yodonio (I) ($\text{IColl}_2\text{PF}_6$)

20 A una disolución de 200 mg (0,80 mmol) de diflunisal en 5 ml de diclorometano se añaden a temperatura ambiente 617 mg (1,2 mmol) de $\text{IColl}_2\text{PF}_6$. Se deja en agitación hasta que se observa mediante HPLC que se ha consumido el producto de partida. Se diluye en diclorometano y se procede a aislar el producto por acidificación con ácido HCl 1 N y extracción con diclorometano. Se reúnen las fases orgánicas y se lavan con una disolución de tiosulfato sódico y después se seca en sulfato magnésico anhidro. Se elimina el disolvente a presión reducida y se obtienen un crudo de pureza 98% que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice. Se obtienen 260 mg (86% de rendimiento) del producto deseado.

30 **Ejemplo 3**

Ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico

5



Por yodación del ácido 5-(2,4-difluorofenil)salicílico (diflunisal) con cloramina T (CAT) y yoduro sódico

10

15

20

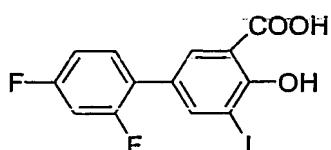
En un matraz de 25 ml se introducen 20 mg (0,08 mmol) de diflunisal, 14 mg (0,093 mmol) de NaI y 30 mg (0,13 mmol) de CAT disueltos en 1040 µl de acetonitrilo y 52 µl de ácido acético. Se deja en agitación durante 1,5 h a temperatura ambiente. Se controla la reacción mediante HPLC hasta que se observa la desaparición del producto de partida y se observa un 96% de producto yodado. Posteriormente se acidifica la disolución hasta pH = 1,0 con una solución al 5% de HCl. A continuación se extrae con acetato de etilo. Se reúnen las fases orgánicas y se lavan con una disolución de tiosulfato sódico y después se seca en sulfato magnésico anhidro. Se elimina el disolvente a presión reducida y se obtienen un crudo de pureza 98% que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice. Se obtienen 25 mg (83% de rendimiento) del producto deseado.

Ejemplo 4

25

Ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico

30



Por yodación del ácido 5-(2,4-difluorofenil)salicílico (diflunisal) con yoduro sódico e hipoclorito sódico

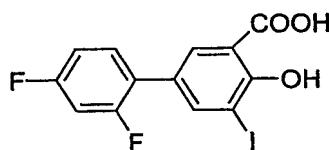
A una disolución de 200 mg (0,80 mmol) de diflunisal en 5 ml de metanol se añade a 0 °C un equivalente de yoduro sódico (165 mg; 1,1 mmol) y un equivalente de hidróxido sódico (32 mg). Una disolución al 4% de hipoclorito sódico se añade gota a gota sobre la disolución anterior durante 75 min manteniendo la temperatura entre 0-3 °C. Tras cada adición se observa un color rojizo que desaparece rápidamente. Se agita a esta temperatura durante una hora más y se trata con una disolución acuosa al 20% de tiosulfato sódico. Se añade una disolución al 5% de HCl y se extrae con diclorometano. Tras su aislamiento, el producto se recristaliza.

Ejemplo 5

15

Ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico

20



25

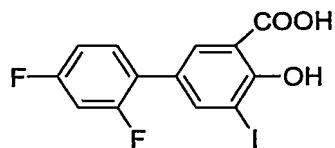
Por yodación del ácido 5-(2,4-difluorofenil)salicílico (diflunisal) con cloruro de yodo (ICl)

30

A una disolución de 200 mg (0,80 mmol) de diflunisal en 5 ml de diclorometano se añade a temperatura ambiente 195 mg (1,2 mmol) de ICl en diclorometano (1 M). Se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 3 h y se procede a aislar el producto tal y como se escribe en el ejemplo 1.

Ejemplo 6**Ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico**

5



Por yodación del ácido 5-(2,4-difluorofenil)salicílico (diflunisal) con yodo y
10 Selectfluor™.

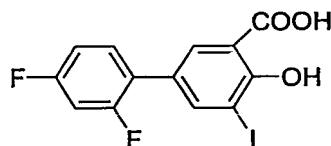
A una disolución de 354 mg (1 mmol) de Selectfluor™ y 127 mg (0,5 mmol)
15 de yodo en 10 ml de acetonitrilo se añaden 200 mg (0,80 mmol) de
diflunisal y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 h. Se trata
con una disolución acuosa al 20% de tiosulfato sódico. Se añade una
disolución al 5% de HCl y se extrae con diclorometano. Tras su aislamiento,
el producto se recristaliza.

Ejemplo 7

20

Ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico

25



Por yodación del ácido 5-(2,4-difluorofenil)salicílico (diflunisal) con N-
yodosuccinimida (NIS)

30

A una disolución de 200 mg (0,8 mmol) de diflunisal en 4 ml de acetonitrilo y
una cantidad catalítica de 1,8 µl (0,24 mmol, 0,3 eq) de ácido trifluoroacético.

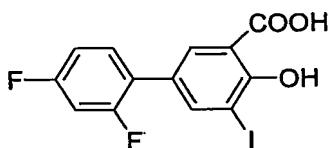
se añade a temperatura ambiente 198 mg (0,88 mmol, 1,1 eq) de NIS. Se deja en agitación. Se evapora el disolvente a presión reducida, se diluye con diclorometano y se procede a aislar el producto tal como en el ejemplo 1.

5

Ejemplo 8

Ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico

10



15 Por yodación del ácido 5-(2,4-difluorofenil)salicílico (diflunisal) con trifluoroacetato de talio y yoduro potásico.

20

25

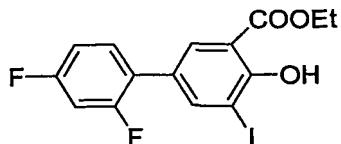
30

Se agita en un matraz una mezcla de 20,6 g de trifluoroacetato de talio (TTFA, 31,9 mmol) y ácido trifluoroacético (TFA, 50 ml) hasta que el TTFA se disuelve. Esta disolución se añade a temperatura ambiente a un matraz que contiene 51 g (205 mmol) de diflunisal y se agita durante 30 min. A la mezcla se añade lentamente una disolución de yoduro potásico (KI, 40,9 g, 245,6 mmol) en 120 ml de agua. Una vez finalizada la reacción se procede a aislar el producto. Primero se añade metabisulfito sódico (NaS_2O_5 , 5,01 g, 26,4 mmol) para reducir las especies de Tl (III) a Tl (I) y posteriormente una disolución de hidróxido sódico para neutralizar el TFA. Se extrae con diclorometano y la fase orgánica se lava con agua y se seca sobre sulfato magnésico. Se evapora el disolvente a presión reducida y se obtiene un crudo de un 96% de pureza que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando los eluyentes apropiados.

Ejemplo 9

5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico de etilo

5



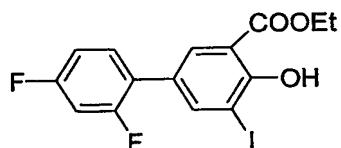
10

Se introducen en un matraz bajo atmósfera inerte 11,5 ml de alcohol etílico y 2,9 ml de cloruro de tionilo (SOCl_2). Se deja en agitación durante 15 min y se introducen 1,67 g (4,56 mmol) de ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico. Se mantiene la agitación a temperatura ambiente hasta que no se observa evolución por HPLC. Se evapora el disolvente a presión reducida y se procede a la extracción con acetato de etilo. Se obtiene un crudo de pureza 97% que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

15

Ejemplo 105-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico de etilo

20



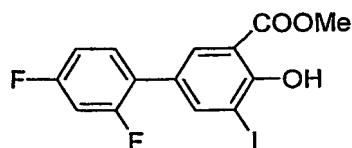
25

Se enfriá a 0 °C una solución de ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico (1,69 g, 4,61 mmol) en etanol (20 ml) y se hace pasar borbotando una corriente de gas clorídrico anhídrico durante 5 min. La disolución se calienta a refluo durante 4 h y se enfriá a temperatura ambiente, los disolventes se evaporan a presión reducida. El residuo se disuelve en diclorometano y se procede a aislar el producto. Se purifica el crudo de reacción por cromatografía en columna de gel de sílice empleando hexano/acetato de etilo (7:3) como eluyente.

30

Ejemplo 11**5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilato de metilo**

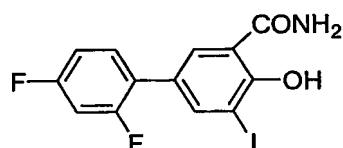
5



- 10 Se introducen en un matraz bajo atmósfera inerte 11,5 ml de metanol y 2,9 ml de cloruro de tionilo (SOCl_2). Se deja en agitación durante 15 min y se introduce 1,67 g (4,56 mmol) de ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico. Se mantiene la agitación a temperatura ambiente hasta que no se observa evolución por HPLC. Se evapora el disolvente a presión reducida y se procede a la extracción con acetato de etilo. Se obtiene un crudo de pureza 97% que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice.
- 15

Ejemplo 12**5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilamida**

25



- Se mezcla 1 g (2,66 mmol) del ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico con 0,738 g (4,01 mmol) de pentafluorofenol en 20 ml de acetonitrilo. Se añaden a 0 °C 10 ml de N,N-diisopropilcarbodiimida y se mantiene en agitación. Se disuelven en agua 0,634 g de bicarbonato amónico. Se observa la desaparición del producto de partida por HPLC y el crudo se
- 30

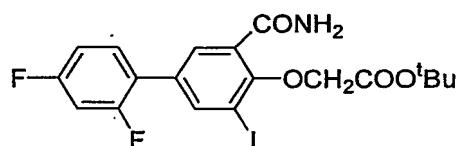
diluye con agua y se extrae con diclorometano. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico y se purifica en columna de gel de sílice, utilizando como eluyentes cloroformo metanol en polaridad ascendente empezando por una proporción (v/v) de (40:1) hasta (10:1).

5

Ejemplo 13

[2-aminocarbonil-4-(2,4-difluorofenil)-6-yodo-fenoxy]acetato de terc-butilo

10



15 A una suspensión de carbonato de cesio (10,4 g, 0,032 mmol) y 2,4 g (0,0064 mol) de la amida 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilamida en 50 ml de DMF se añade cloroacetato de terc-butilo (1,2 g, 0,008 mmol). La reacción se agita durante 30 min a temperatura ambiente y se vierte sobre una disolución fría de ácido clorhídrico 1 N y se extrae con acetato de etilo. 20 Se combinan las fases orgánicas y se secan sobre sulfato magnésico. Tras eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida se obtiene un crudo que se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice. Se obtiene el derivado deseado con un 90% de rendimiento.

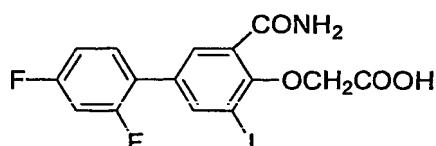
20

25

Ejemplo 14

Ácido-[2-aminocarbonil-4-(2,4-difluorofenil)-6-yodo-fenoxy]acético

30



Método A:

Se obtiene por reacción del éster del ejemplo 13 con ácido trifluoroacético. Tras unos minutos en agitación a temperatura ambiente se evapora en corriente de nitrógeno el ácido trifluoroacético residual y se extrae con acetato de etilo.

5

Método B

Se obtiene por hidrólisis del éster del ejemplo 13 en este caso con ácido clorhídrico. El éster (400 mg, 0,817 mmol) se disuelve en 40 ml de una mezcla al 50% (v/v) de isopropanol y THF. Se añaden 2 ml de una disolución 1 N de HCl. La reacción se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo.

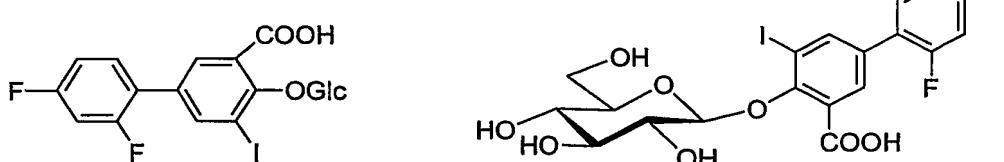
10

Ejemplo 15

15

1-O- β -Glucósido del ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico

20



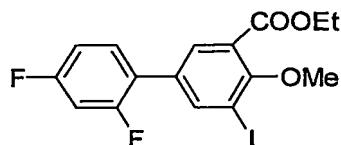
30

A -40 °C y bajo atmósfera de nitrógeno se añaden gota a gota 506 µl (4 mmol) de una disolución del complejo de trifluoruro de boro eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) en diclorometano a una disolución de 200 mg (0,80 mmol) del compuesto fenólico, el ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico, y de 985 mg (2 mmol) del 1-tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-glucopiranósilo en diclorometano. La mezcla se agita hasta que no se observa producto de partida por TLC (cromatografía de capa fina). El exceso de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ se destruye con bicarbonato sódico. Se diluye con diclorometano y se lava con agua. La fase orgánica se seca sobre sulfato

magnésico y se elimina el disolvente a presión reducida. El producto final se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice. El derivado protegido se somete a una saponificación en metanol con una cantidad catalítica de metóxido sódico (reacción de Zemplen). Se acidifica en frío la reacción una vez finalizada y se extrae con diclorometano. Se procede a aislar el producto como es usual.

Ejemplo 16

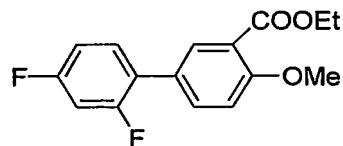
10 2',4'-difluoro-4-metoxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo



15

Etapa 1 - Preparación del 2',4'-difluoro-4-metoxi-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo

20



Método A

25 Este compuesto bifenílico se prepara mediante una reacción de acopiamiento cruzado de Suzuki catalizada por Pd(0) a partir del ácido berénico correspondiente y un bromo- o yododerivado.

En primer lugar se prepara el bromoderivado que es el ácido 5-bromo-2-metoxibenzoato de etilo. Este se obtiene en dos pasos de síntesis a partir del aldehído comercial 5-bromo-o-anisaldehído, que primero se trata con una disolución permanganato para obtener el

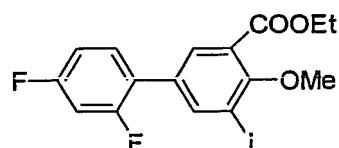
correspondiente ácido carboxílico y posteriormente se procede a la esterificación del mismo, mediante la formación *in situ* del correspondiente cloruro de ácido por reacción con cloruro de tionilo y reacción con el etanol.

Reacción de Suzuki: A una disolución en dioxano de 190 mg (1,21 mmol, 1 eq) de ácido 2,4-difluorofenilborónico, se añaden 1,15 ml (2,29 mmol, 2 eq) de una disolución acuosa 2N de carbonato de sodio y 17 mg (0,111 mmol, 0,096 eq) del catalizador de Pd (0), la tetraquis(trifenil)fosfina paladio (0), y finalmente 300 mg (1,16 mmol) del bromoderivado (5-bromo-2-metoxibenzoato de etilo). Se calienta a reflujo durante 2 h. Se deja enfriar y se filtra el catalizador a través de una columna de gel de sílice. Se diluye con diclorometano y se extrae con agua. Tras aislar el producto como es usual, se obtienen 330 mg de un crudo de alta pureza (95% por HPLC).

Método B

En este caso se obtiene por reacción de Williamson (preparación de éteres asimétricos) a partir del éster etílico del diflunisal y yoduro de metilo en presencia de carbonato de cesio en acetonitrilo.

Etapa 2 - Preparación del 2',4'-difluoro-4-metoxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo

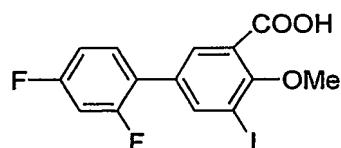


Por yodación del producto obtenido en la etapa 1, el 2',4'-difluoro-4-metoxi-[1,1'bifenil]-3-carboxilato de etilo, con el reactivo Ipy_2BF_4

A 0 °C a una disolución de 200 mg (0,684 mmol) del 2',4'-difluoro-4-metoxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo en 5 ml de diclorometano y un 10% de ácido trifluoroacético (500 µl) se añaden 305 mg (0,821 mmol, 1,2 eq) de tetrafluoroborato de bis(piridina)yodonio (I) (Ipy_2BF_4). Se deja calentar en agitación a temperatura ambiente hasta que se observa mediante HPLC que se ha consumido el producto de partida. Se diluye en diclorometano y se procede a aislar el producto por acidificación con ácido HCl 1 N y extracción con diclorometano. Se reúnen las fases orgánicas y se lavan con una disolución de tiosulfato sódico y después se seca en sulfato magnésico anhídrico. Se elimina el disolvente a presión reducida y se obtienen un crudo de pureza 98% que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice. Se obtienen 260 mg (90% de rendimiento) del producto deseado.

15 Ejemplo 17

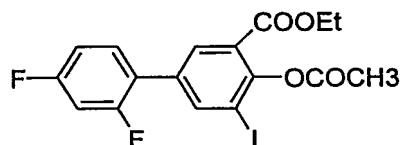
Ácido 2',4'-difluoro-4-metoxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxílico



25 Este compuesto se obtiene por saponificación del éster del ejemplo anterior (Ejemplo 16) (2',4'-difluoro-4-metoxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo). Se disuelve el éster (200 mg, 0,48 mmol) en 20 ml de etanol y una disolución 2,5 N de NaOH durante 2 h. Tras enfriar la mezcla se acidifica con ácido clorhídrico y se extrae con diclorometano. Tras aislar el producto, se obtiene un crudo que se recristaliza en una mezcla de cloroformo/hexano.

Ejemplo 182',4'-difluoro-4-acetiloxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo

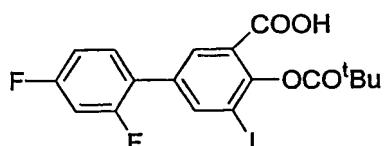
5



- 10 Se calienta una mezcla de 500 mg (1,24 mmol) del 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilato de etilo (Ejemplo 10) en 12 ml de piridina y 3 ml de anhídrido acético en un baño de agua durante 20 min. La mezcla se deja enfriar y se vierte sobre hielo y el producto se extrae con diclorometano. Después de secar la fase orgánica y tras la evaporación a presión reducida del disolvente el crudo se recristaliza.
- 15

Ejemplo 19Ácido 2',4'-difluoro-4-(*t*-butilcarboniloxi)-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxílico

25



30

- Se añaden 0,928 g (0,0067 mmol) de cloroformiato de *n*-butilo a una mezcla de 2,5 g (0,0061 mmol) de ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico en 6 ml de benceno y 1,728 g (0,014 mmol) de dimetilanilina. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h. Se añade hielo y una disolución 2,5 N de HCl. Se extrae con diclorometano y se seca la fase orgánica sobre sulfato

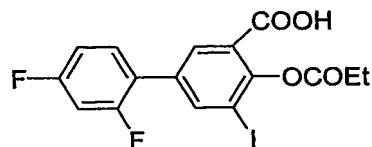
magnésico. Se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo se recristaliza en una mezcla de cloroformo/hexano.

Ejemplo 20

5

Ácido 2',4'-difluoro-4-(etilcarboniloxi)-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxílico

10



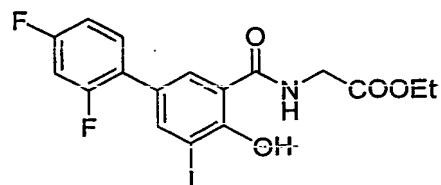
20

Se añaden 0,928 g (0,0086 mmol) de cloroformiato de etilo a una mezcla de 2,5 g (0,0061 mmol) de ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico en 6 ml de benceno y 1,728 g (0,014 mmol) de dimetilanilina. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h. Se añade hielo y una disolución 2,5 N de HCl. Se extrae con diclorometano y se seca la fase orgánica sobre sulfato magnésico. Se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo se recristaliza en una mezcla de cloroformo-hexano.

25

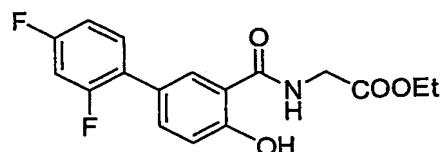
Ejemplo 21

Éster etílico de la N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]-glicina



30

Etapa 1 - Preparación del éster etílico de la N-[5-(2,4-difluorofenil)saliciloil]-glicina



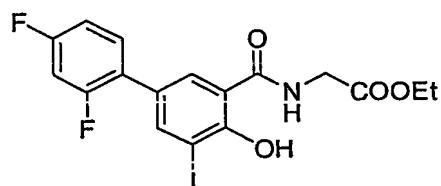
5

En un matraz se introducen 500 mg (1,998 mmol) de diflunisal y 270 mg (1,99 mmol) de HOBt disueltos en la mínima cantidad de diclorometano. A temperatura ambiente se añaden a la mezcla 206 mg (1,99 mmol) del éster etílico de la glicina (H-Gly-OEt) y por último se añaden 412 mg (2 mmol) de DCC (dicitohexilcarbodiimida) disueltos en la mínima cantidad de diclorometano. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente El proceso se controló por HPLC observándose la desaparición total del producto de partida tras una hora de reacción. Se elimina el disolvente a presión reducida y se redissuelve en acetato de etilo observándose la precipitación de la urea correspondiente que se filtra. El crudo de reacción se purifica en columna de gel de sílice con una mezcla de eluyentes hexano/acetato de etilo (75:25). Se obtienen 381 mg de producto puro deseado con un rendimiento del 35%.

20

Etapa 2 - Preparación del éster etílico de la N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]-glicina

25

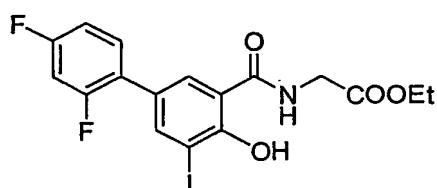


A una disolución de 200 mg (0,596 mmol) del compuesto de la etapa 1 (éster etílico de la N-[5-(2,4-difluorofenil)saliciloil]glicina) en 5 ml de diclorometano se añade a temperatura ambiente 266 mg (0,715 mmol)

de tetrafluoroborato de bis(piridina)yodonio (I) (Ipy_2BF_4). Se deja en agitación hasta que se observa mediante HPLC que se ha consumido el producto de partida. Se diluye en diclorometano y se procede a aislar el producto por acidificación con ácido HCl 1 N y extracción con diclorometano. Se reúnen las fases orgánicas y se lavan con una disolución de tiosulfato sódico y después se seca en sulfato magnésico anhidro. Se elimina el disolvente a presión reducida y se obtiene un crudo de pureza 98% que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice. Se obtienen 240 mg (87% de rendimiento) del producto deseado.

Ejemplo 22

Éster etílico de la N -[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]glicina



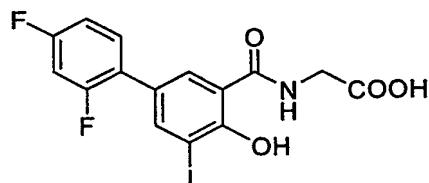
En un matraz se introducen 500 mg (1,32 mmol) de ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico (del Ejemplo 1) y 270 mg (1,99 mmol) de HOBr disueltos en la mínima cantidad de diclorometano. A temperatura ambiente se añaden a la mezcla 163 mg (1,58 mmol) del éster etílico de la glicina (H-Gly-OEt) y, por último, se añaden 272 mg (1,32 mmol) de DCC disueltos en la mínima cantidad de diclorometano. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente. El proceso se controló por HPLC observándose la desaparición total del producto de partida tras una hora de reacción. Se elimina el disolvente a presión reducida y se redissuelve en acetato de etilo observándose la precipitación de la urea correspondiente que se filtra. El crudo de reacción se purifica en columna de gel de sílice con una mezcla de eluyentes hexano/acetato de etilo (75:25). Se obtienen 400 mg (75% de

rendimiento) de producto puro deseado.

Ejemplo 23

5 N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]glicina

10



15

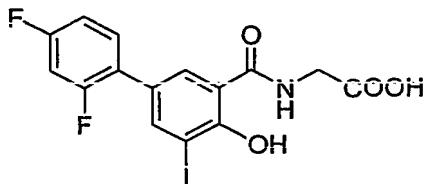
20

A una disolución del éster del Ejemplo 22 (480 mg, 1,19 mmol) en 5 ml de dioxano acuoso (v/v 1:1) se añade hidróxido de litio (0,038 mg, 0,92 mmol) y se agita bajo atmósfera de nitrógeno durante 12 h. La mezcla se concentra a presión reducida, se diluye con agua (10 ml) y se acidifica con una disolución 0,5 M de ácido clorhídrico, y se extrae con acetato de etilo. Las fases orgánicas se reúnen y se lavan con agua saturada de cloruro sódico y se secan sobre sulfato sódico. Se elimina el disolvente a presión reducida y se obtiene un crudo del 98% de pureza que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Ejemplo 24

25 N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]glicina

30

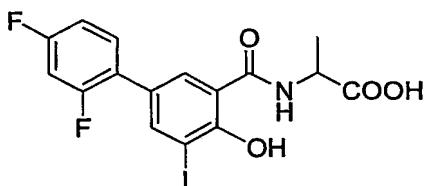


Se disuelven 0,124 g (0,31 mmol) de producto puro (éster del Ejemplo 22)

en una mezcla ternaria (THF:MeOH:H₂O) (3:1:1) y se le adiciona a 0 °C y gota a gota una disolución acuosa 0,1 N de LiOH. Posteriormente se deja a temperatura ambiente durante 20 min, cuando la reacción ha finalizado se acidifica con HCl 1 N hasta pH = 2 y se realizan 3 extracciones con acetato etílico y cloroformo. Las fases orgánicas se reúnen y se lavan con agua saturada de cloruro sódico y se secan sobre sulfato sódico. Se elimina el disolvente a presión reducida y se obtiene un crudo del 98% de pureza que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

10 **Ejemplo 25**

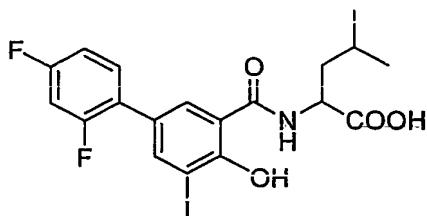
N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]alanina



Partiendo del precursor éster metílico (obtenido mediante un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 22 partiendo del éster etílico de la alanina) por saponificación tal como se describe en el Ejemplo 23 o en el Ejemplo 24.

20 **Ejemplo 26**

25 N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]-leucina



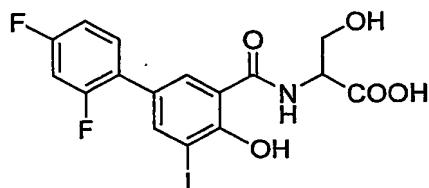
Partiendo del precursor éster metílico (obtenido mediante un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 22 partiendo del éster etílico de la leucina) por saponificación tal como se describe en el Ejemplo 23 o en el Ejemplo 24.

5

Ejemplo 27

N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]-serina

10



Partiendo del precursor éster metílico (obtenido mediante un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 22 partiendo del éster etílico de la serina) por saponificación tal como se describe en el Ejemplo 23 o en el Ejemplo 24.

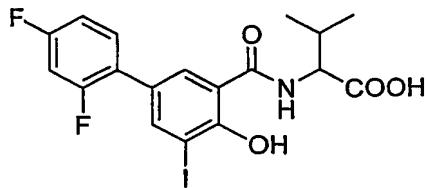
15

Ejemplo 28

20

N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]-valina

25



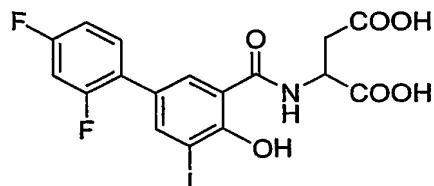
Partiendo del precursor éster metílico (obtenido mediante un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 22 partiendo del éster etílico de la valina) por saponificación tal como se describe en el Ejemplo 23 o en el Ejemplo 24.

30

Ejemplo 29

Ácido N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]-aspártico

5

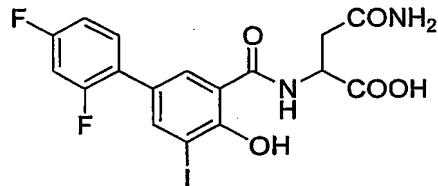


Partiendo del precursor éster metílico (obtenido mediante un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 22 partiendo del éster etílico del ácido aspártico) por saponificación tal como se describe en el Ejemplo 23 o en el Ejemplo 24.

15

Ejemplo 30

20

N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]-asparagina

Partiendo del precursor éster metílico (obtenido mediante un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 22 partiendo del éster etílico de la asparagina) por saponificación tal como se describe en el Ejemplo 23 o en el Ejemplo 24.

25

EJEMPLO DE ACTIVIDAD

30 Ensayo de actividad inhibidora de amiloidogénesis *in vitro*.
Los compuestos de esta invención se han evaluado en un ensayo

turbidiométrico cuyos principales características son las siguientes:

- 1) uso del mutante Y78F (tirosina78 reemplazada por fenilalanina) altamente amiloidogénico para incrementar la sensibilidad;
- 5 2) ensayo cinético monitorizando la formación de fibrillas (por incremento de la absorbancia a 340 nm en el tiempo) durante 1 h y 30 min para determinar la velocidad inicial de formación de fibrillas;
- 10 3) formato del ensayo en microplacas de 96 pocillos para el análisis rápido de varias muestras simultáneamente y a varias concentraciones de inhibidor;
- 15 4) cálculo de parámetros de inhibición de cada inhibidor a partir de las curvas de velocidad inicial de formación de fibrillas frente a la concentración de inhibidor.

Protocolo:

20 Los compuestos a ensayar como inhibidores se disuelven en DMSO a concentración 1,5 mM. La disolución de trabajo se prepara por dilución 1 a 4 de la anterior en una mezcla agua/DMSO (2:1). La disolución de proteína (mutante Y78F hTTR) es 4 mg/ml de proteína (pureza mayor del 95%) en fosfato sódico 20 mM, cloruro potásico 100 mM, pH 7,6. El tampón de incubación es fosfato sódico 10 mM, cloruro potásico 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6. El tampón de dilución es acetato sódico 400 mM, cloruro potásico 100 mM, EDTA 1 mM, pH 4,2. El protocolo de ensayo para un inhibidor es el siguiente: se dispensan 20 µl de la disolución de proteína en 7 pocillos de una microplaca de 96 pocillos. Diferentes volúmenes de la disolución de trabajo del inhibidor se añaden a cada uno de los pocillos para obtener concentraciones finales de 0 a 40 µM. Seguidamente se añade a cada

25

30

pocillo el tampón de incubación hasta un volumen final de 100 µl. La microplaca se incuba a 37 °C dentro del lector de microplacas provisto de termostatación y agitación. La incubación se extiende por 30 min a 37 °C con agitación durante 15 segundos cada minuto. Seguidamente se adicionan 100 µl de tampón de dilución a cada pocillo, y la mezcla se incuba a 37 °C con agitación durante 15 segundos cada minuto en el lector de microplacas y se monitoriza la absorbancia a 340 nm durante 1 hora y 30 minutos a intervalos de 1 minuto. Los datos de absorbancia frente al tiempo para cada pocillo se recogen y se analizan con el programa Microsoft Excel.

5 Todos los ensayos se realizan por duplicado.

Cálculos:

15 1.- Velocidad inicial de formación de fibrillas. De las lecturas de absorbancia a 340 nm con el tiempo de incubación para cada pocillo se calcula la velocidad inicial de formación de fibrillas como la pendiente de la zona lineal inicial de la curva. Así se obtiene la velocidad de agregación a cada concentración de inhibidor.

20 2.- Velocidad de agregación frente a la concentración de inhibidor. Las velocidades de agregación frente a la concentración de inhibidor siguen un comportamiento de decaimiento exponencial que se ajusta a la ecuación:

$$v_0 = A + B \cdot e^{-C[I]}$$

25 donde v_0 es la velocidad de agregación (en unidades de absorbancia por hora) y $[I]$ la concentración de inhibidor en µM.

30 En la Figura 1 se muestra la variación de la velocidad de agregación, v_0 , con respecto a la concentración de inhibidor, $[I]$, para un compuesto de la invención, yododiflunisal, con respecto a dos compuestos de la técnica,

diflunisal y diflunisal éster.

Los parámetros ajustados son: A (en unidades de absorbancia por hora), velocidad residual de agregación a alta concentración de inhibidor; B (en unidades de absorbancia por hora), amplitud o máxima disminución de la velocidad de agregación; y C (μM^{-1}) la constante exponencial. A+B es la velocidad de agregación en ausencia de inhibidor (velocidad de agregación máxima). De estos parámetros se extraen los parámetros que caracterizan a cada inhibidor en cuanto a su capacidad y eficiencia de inhibir la formación de fibrillas:

- IC_{50} : concentración de inhibidor (μM) a la que la velocidad de agregación es la mitad que en ausencia de inhibidor;
- Ψ : pendiente inicial de la curva v_0 frente $[I]$, que refleja la sensibilidad del proceso de agregación al inhibidor. A mayores valores de Ψ , mayor efecto inhibitor del compuesto a tiempos iniciales de formación de fibrillas;
- $\text{RA}(\%) = (1-A/(A+B)) \cdot 100$: % de reducción de la velocidad de agregación a concentración alta de inhibidor respecto a la velocidad en ausencia de inhibidor.

De acuerdo con este ensayo, un buen inhibidor es aquel que posee una IC_{50} baja, un valor Ψ alto, y un valor $\text{RA}(\%)$ cercano a 100%.

Los resultados se muestran en la Tabla 1. En ella se dan los valores de los parámetros mencionados para el diflunisal y derivados, yodados y sin yodar. Como puede verse, los compuestos yodados presentan una actividad claramente mejorada con respecto a los compuestos sin yodar.

Tabla 1. Diflunisal y derivados: efecto de la yodación

Inhibidor	Estructura	IC_{50} (μM)	Ψ ($UA \cdot h^{-1} \cdot \mu M^{-1}$)	RA (%)
Diflunisal		12,9	0,036	84
Iododiflunisal		4,5	0,100	97
Diflunisal metil éster		>100	0,011	24
Iododiflunisal metil éster		16,7	0,027	98
Diflunisal amida		>100	0,009	10
Iododiflunisal amida		11,7	0,041	84
Diflunisal glicina		>100	0,011	28
Iododiflunisal glicina		11,2	0,040	100

5

10

15

20

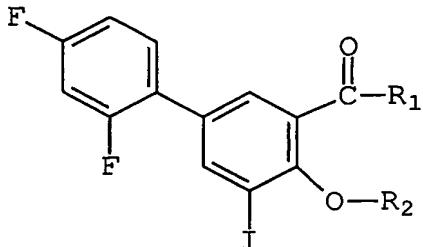
25

30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula estructural (I):

5



10

(I)

en la que

R₁ es un grupo -NR_aR_b, siendo R_a y R_b, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆; un grupo -OR_c siendo R_c un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆; un glucosilo; un polihidroxialquilo C₁-C₆; o un grupo -NH-CH(R_d)-COOR_e, siendo R_d una cadena lateral de uno de los 20 alfa-aminoácidos naturales en cualquiera de sus dos formas L o D enantioméricamente puras y R_e un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆; y

20 R₂ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, un glucosilo; un polihidroxialquilo C₁-C₆; un grupo -C(=O)-R_f, siendo R_f un grupo alquilo C₁-C₆; o un grupo -CH₂-COO-R_g, siendo R_g un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆;

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

25

2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque R₁ se selecciona de entre: OH; NH₂; OMe; OEt; o un grupo CH(R_d)-COR_e, siendo R_d la cadena lateral de la glicina, la alanina, la leucina, la valina, el ácido aspártico o la asparagina y siendo R_e H o un grupo alquilo C₁-C₆; y R₂ se selecciona entre: H; Me; glucosilo; un grupo -C(=O)-R_f, siendo R_f un grupo Me, Et, t-Bu; o un grupo -CH₂-COO-R_g, siendo R_g un átomo de hidrógeno o

un grupo t-Bu.

3. Compuesto según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se selecciona de entre los siguientes compuestos:

- 5 [1] ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico;
[2] 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilato de etilo;
[3] 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilato de metilo;
[4] 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicilamida;
- 10 [5] [2-aminocarbonil-4-(2,4-difluorofenil)-6-yodo-fenoxy]-acetato de terc-butilo;
[6] ácido [2-aminocarbonil-4-(2,4-difluorofenil)-6-yodo-fenoxy]acético;
[7] 1-O-β-glucósido del ácido 5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-salicílico;
[8] 2',4'-difluoro-4-metoxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo;
- 15 [9] ácido 2',4'-difluoro-4-metoxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxílico;
[10] 2',4'-difluoro-4-acetiloxi-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxilato de etilo;
[11] ácido 2',4'-difluoro-4-(*t*-butilcarboniloxi)-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxílico;
[12] ácido 2',4'-difluoro-4-(etilcarboniloxi)-5-yodo-[1,1']bifenil-3-carboxílico;
[13] éster etílico de la N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]glicina;
- 20 [14] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]glicina;
[15] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]alanina;
[16] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]leucina;
[17] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]serina;
[18] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]valina;
- 25 [19] ácido N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]-aspártico;
[20] N-[5-(2,4-difluorofenil)-3-yodo-saliciloil]asparagina.

4. Un procedimiento de preparación del compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende una etapa de reacción del difluorisai o derivados del mismo con un reactivo de yodación.

5. Procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado porque dicho reactivo de yodación puede seleccionarse de entre: yodo elemental; sales de yoduro tales como yoduro sódico o yoduro potásico; sales de yodonio tales como cloruro de yodo; complejos de yodonio tales como el tetrafluoroborato de bis(piridina)yodonio (I) o el hexafluorofosfato de bis(sim-colidina)yodonio (I); y compuestos orgánicos de yodo tales como el diacetato de yodobenceno o la N-yodosuccinimida.

10. Una composición farmacéutica que contiene un compuesto según las reivindicaciones 1 a 3 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

15. Un compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 1 a 3 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas amiloïdes, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, fibrosis cística, diabetes de aparición tardía, enfermedad de las neuronas motoras, fiebre mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, mieloma idiopático, cardiopatía amiloide, síndrome de Down, enfermedad de Kuru, síndrome de Gerstmann-Straussler-Schienker, depósitos valvulares de amieloide, amiloidosis en pacientes con diálisis, miositis con cuerpos de inclusión, depósitos musculares de amieloide, anemia de Sickle Cell, amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide familiar I, polineuropatía amiloide familiar III, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, amiloidosis relacionada con angiopatías, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa, diabetes de tipo II, carcinoma medular de tiroides, encefalopatía espongiforme, amiloidosis atrial, amiloidosis sistémica hereditaria no neuropática, amiloidosis localizada por inyección, y amiloidosis renal hereditaria.

30. El empleo de un compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 1

a 3 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas amiloides, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, fibrosis cística, diabetes de aparición tardía, enfermedad de las neuronas motoras, fiebre mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, mieloma idiopático, cardiopatía amiloide, síndrome de Down, enfermedad de Kuru, síndrome de Gerstmann-Straussler-Schienker, depósitos valvulares de amieloide, amiloidosis en pacientes con diálisis, miositis con cuerpos de inclusión, depósitos musculares de amieloide, anemia de Sickle Cell, amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide familiar I, polineuropatía amiloide familiar III, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, amiloidosis relacionada con angiopatías, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa, diabetes de tipo II, carcinoma medular de tiroides, encefalopatía espongiforme, amiloidosis atrial, amiloidosis sistémica hereditaria no neuropática, amiloidosis localizada por inyección, y amiloidosis renal hereditaria.

9. El empleo de un compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 1 a 3 en la elaboración de un medicamento analgésico, antiinflamatorio, antipirético o antiagregante plaquetario para el tratamiento de enfermedades tales como artritis reumatoide, fiebres reumatóides, osteoartritis, dolores musculoesqueléticos, síndrome del intestino inflamado, enfermedades de las arterias coronarias o trombosis postoperatorias en venas profundas.

1/1

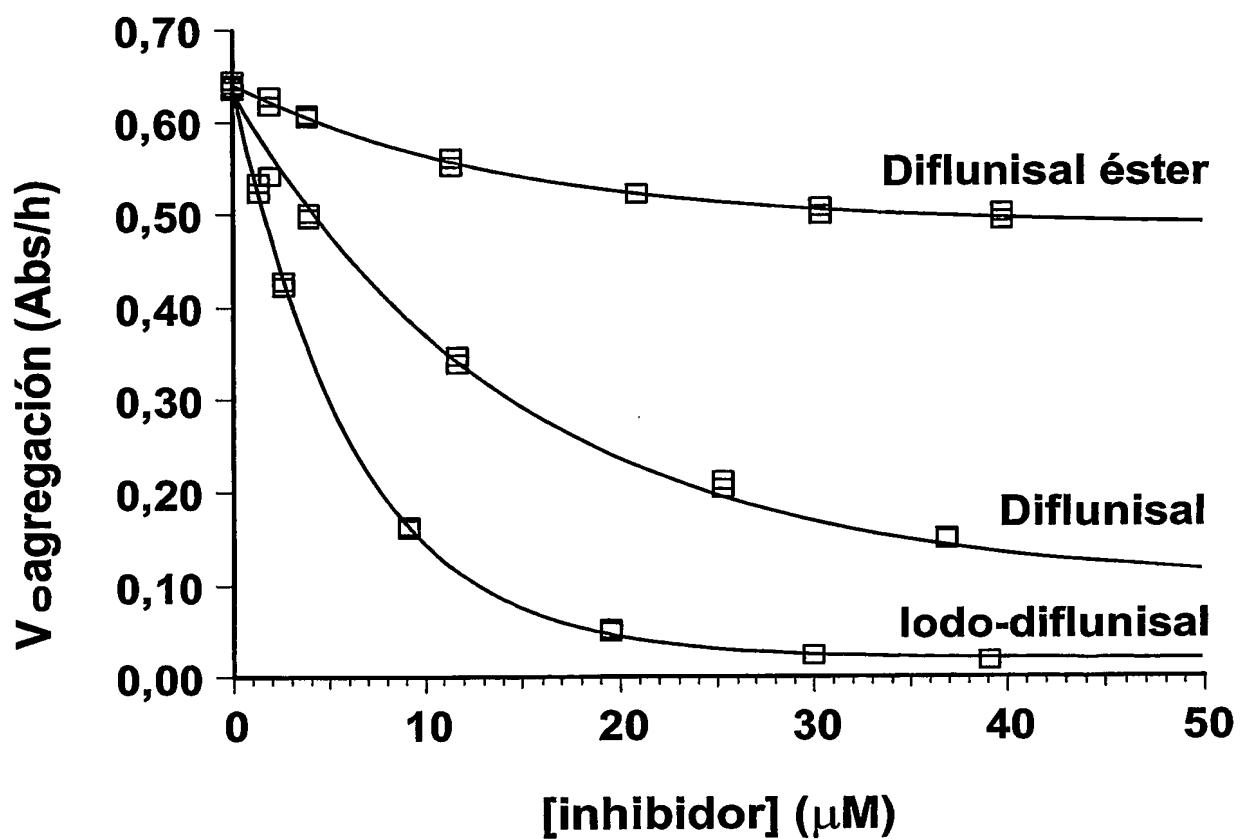


FIG.1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2003/000510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C07C65/05, 69/94, 233/66, A61K31/603, A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C07C, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, WPI, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9846234 A (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND) 22.10.1998, reivindicaciones.	1-9
A	EP 082404 A (MERCK & CO. INC) 29.06.1983, reivindicaciones.	1-9
A	WO 9820864 A (UNIVERSITA DEGLI STUDI DI BRESCIA) 22.05.1998, página 1, línea 6 - página 2, línea 5, reivindicaciones 4-7.	1-9

—Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“T” earlier document but published on or after the international filing date

“E” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of actual completion of the international search
20 April 2004 (20.04.2004)Date of mailing of the international search report
30 April 2004 (30.04.2004)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Telephone No.

Fax No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2003/000510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846234 A	22.10.1998	AU 6910898 A US 6593365 B US 2003220497 A	11.11.1998 15.07.2003 27.11.2003
EP 0082404 AB	29.06.1983	PT 76003 AB NO 824280 A NO 156200 B NO 156200 C FI 824202 A DK 562482 A AU 9133182 A JP 58116440 A ES 8401924 A ZA 8209334 A GR 77835 A CA 1191153 A US 4542158 A NZ 202721 A AT 17941 T DE 3269109 D AU 563270 B	01.01.1983 22.06.1983 04.05.1987 12.08.1987 22.06.1983 22.06.1983 30.06.1983 11.07.1983 01.04.1984 25.07.1984 25.09.1984 30.07.1985 17.09.1985 13.12.1985 15.02.1986 27.03.1986 02.07.1987
WO 9820864 A	22.05.1998	ITMI	13.05.1998

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2003/000510

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C07C65/05, 69/94, 233/66, A61K31/603, A61P25/28

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP⁷ C07C, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, WPI, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 9846234 A (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND) 22.10.1998, reivindicaciones.	1-9
A	EP 082404 A (MERCK & CO. INC) 29.06.1983, reivindicaciones.	1-9
A	WO 9820864 A (UNIVERSITA DEGLI STUDI DI BRESCIA) 22.05.1998, página 1, línea 6 - página 2, línea 5, reivindicaciones 4-7.	1-9

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"L" documento que pueda plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita c. por una razón especial (como la indicada).	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Z"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 29 Abril 2004 (20:04:2004)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 30 ABR 2004 30.04.2004
Domicilio y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional Calle de Alcalá 1, 28071 Madrid, España. Teléfono +34 91 3495304	Funcionario autorizado H. Aylagas Cancio Nº de teléfono + 34 91 3495475

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2003/000510

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9846234 A	22.10.1998	AU 6910898 A US 6593365 B US 2003220497 A	11.11.1998 15.07.2003 27.11.2003
EP 0082404 AB	29.06.1983	PT 76003 AB NO 824280 A NO 156200 B NO 156200 C FI 824202 A DK 562482 A AU 9133182 A JP 58116440 A ES 8401924 A ZA 8209334 A GR 77835 A CA 1191153 A US 4542158 A NZ 202721 A AT 17941 T DE 3269109 D AU 563270 B	01.01.1983 22.06.1983 04.05.1987 12.08.1987 22.06.1983 22.06.1983 30.06.1983 11.07.1983 01.04.1984 25.07.1984 25.09.1984 30.07.1985 17.09.1985 13.12.1985 15.02.1986 27.03.1986 02.07.1987
WO 9820864 A	22.05.1998	ITMI	13.05.1998